

親和性および不親和性組合せのイネ葉身上におけるいもち病菌
(*Pyricularia oryzae* Cav.) の孢子発芽率と付着器形成率

古 賀 博 則

Hironori KOGA : Comparison of spore germination and appressorial formation of
Pyricularia oryzae Cav. on rice leaves in compatible and incompatible combinations

Summary

Spore germination and formation of appressoria of *Pyricularia oryzae* Cav. race 037 on the rice leaves were compared between compatible and incompatible combinations. Spore germination and formation of appressoria of spores inoculated were observed with an aid of fluorescence microscope after they were stained with Calcofluor White. This method makes it possible to calculate exactly the percentages of spore germination and appressorial formation to all the spores inoculated, because they could be observed without falling off from the rice leaves.

1) The percentages of spore germination and appressorial formation showed no statistical differences among various densities of spore suspension in both compatible and incompatible combinations.

2) The curves representing percentages of spore germination, immature and mature appressorial formation showed no differences between compatible and incompatible combinations.

3) There were no significant differences in the percentages of spore germination and mature appressorial formation among 9 Japanese differential varieties and var. Koshihikari (6 compatible and 4 incompatible combinations) in the both inoculation methods by the use of spore suspension and dry spores.

4) From these results, it was suggested that the specific resistance controlled by the major genes is not expressed before fungal penetration into rice leaves.

イネいもち病菌の発芽および付着器形成に影響を及ぼす諸環境要因については、これまで多数報告されている^{1, 10, 12, 13, 15}。しかし、抵抗性の異なるイネ品種の葉身上での接種孢子の発芽および付着器形成の品種間差異については、2, 3の報告があるにすぎず、一致した結論は得られていない^{1, 3, 11}。その原因としては実験方法に問題があると考えられる。すなわち、イネ葉身上に接種した孢子は、水滴とともに自然落下したり、また接種葉片の固定・染色操作により接種した孢子は葉身上から脱落する。したがって、葉身上に接種したすべての孢子に対する発芽孢子および付着器形成孢子の比率を正確に算出するためには、葉身からの孢子脱落を防止して観察を行う必要がある。

本報告では、上記の条件を考慮した接種法および観察方法により、イネ葉身上での孢子の発芽率および付着器

形成率が親和性組合せと不親和性組合せとで異なるかどうかを明らかにすることを目的とした。

本報を草するにあたり、当场病害第1研究室堀野 修博士に試験遂行上有益な助言および本稿の御校閲を頂いた。また、当场病害第2研究室小林尚志前室長に終始御教示を頂いた。供試したカルコフルオールホワイトは、日本化薬より提供して頂いた。ここに記して深謝の意を表する。

実験材料および方法

供試菌には、イネいもち病菌菌株研60-19 (レース037 14) を用い、関口・古田⁹)の方法によりオートミル寒天培地上に形成させた分生孢子を接種源とした。供試イネ品種には、この菌株に対して不親和性のとりで1号(抵抗性遺伝子 $Pi-z'$)、フクニシキ ($Pi-z$)、ヤシロモチ ($Pi-ta$)、Pi No. 4 ($Pi-ta^2$) と親和性のコシヒカリ(+), 新2号 ($Pi-k'$)、愛知旭 ($Pi-a$)、石狩白毛 ($Pi-i$)、関

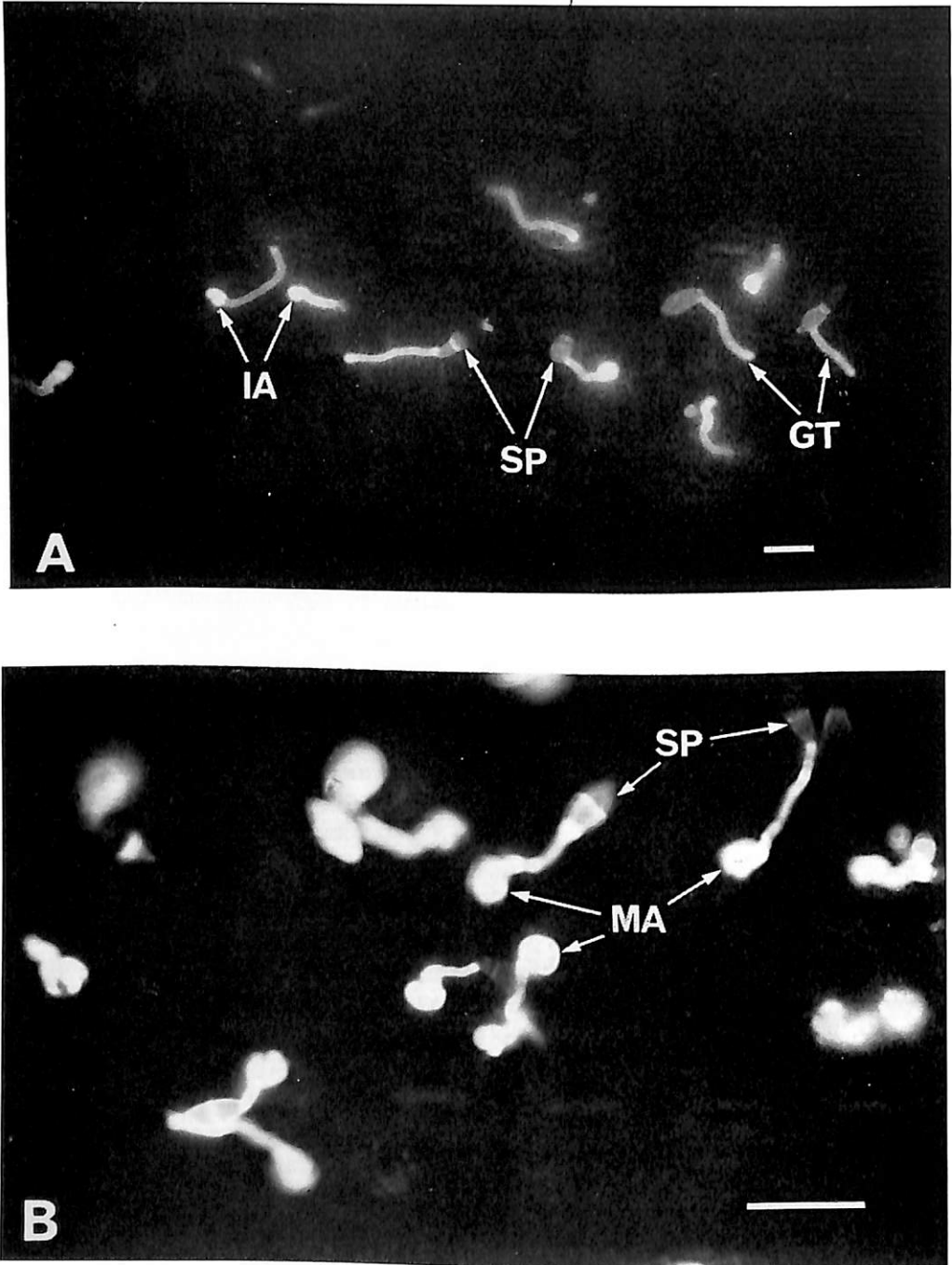


Fig. 1 Fluorescence photographs of spore germination, immature and mature appressorial formation of *Pyricularia oryzae* Cav. race 037 on the rice leaves of variety Toride 1 (incompatible combination), A) 4.5 hr and B) 8.0 hr after inoculation. Specimens were stained with Calcofluor White to impart fluorescence to fungal structures and observed under an Olympus fluorescence microscope. Each bar in the micrographs represents 20 μ m.

Abbreviations; SP: spore, GT: germ tube, IA: immature appressorium, MA: mature appressorium

東51号 (*Pi-k*), ツユアケ (*Pi-k^m*) を用いた。

実験には6.5葉期のイネを供試し、異なる2種の接種法を適用した。接種法の一つは、イネから展開最上葉を切り離すことなく、表面を上水平に保って葉身を固定した。その葉身上にシリコンチューブを薄切りして作ったリング(内径4mm厚さ0.5mm)を載せ、リング内に孢子懸濁液 (Table 1 参照) を注入して接種した。対照区では葉身のかわりにスライドガラスを用いた。なお、接種イネおよびスライドガラスは24±1Cに所定時間保った。接種法については特に記述しない限り、この方法で実験を行った。他の接種方法では、前述と同様の方法で固定した葉身上に、培地上の乾燥孢子をガーゼにつけ、葉身に軽く付着させて孢子を接種した。対照区では葉身のかわりにスライドガラスを用いた。接種後、イネおよびスライドガラスを24±1C、相対湿度100%の温室に保ち、葉身上に微小水滴が形成されるようにした。

発芽孢子および付着器形成孢子の染色には0.01%カルコフルオールホワイト (Kayaphor FB conc, 日本化薬株式会社) 水溶液を用いた。観察時にこの染色液を注射

器で、葉身上に数滴滴下してマウントし、オリンパス落射蛍光顕微鏡装置.BH-RFL-LB, B励起 [励起フィルター B (IF490), 吸収フィルター O 530] で孢子の発芽および付着器形成を観察した。

発芽管が孢子長径の50%以上に伸長しているものを発芽孢子とみなした (Fig. 1—A)。また、付着器形成の計測は未成熟付着器 (Fig. 1—A) と成熟付着器形成 (Fig. 1—B) とに区別して行った。

実験結果

接種孢子濃度と発芽率および付着器形成率との関係

接種孢子濃度を 5×10^2 個/ml から 5×10^4 個/ml まで異にした場合、イネ葉身上での接種孢子濃度の発芽率および成熟付着器形成率を Table 1 に示した。発芽率は親和性および不親和性組合せともに、いずれの接種孢子濃度区においても98~100%であり、異なる接種孢子濃度による発芽率に有意差は認められなかった。また、成熟付着器形成率は両組合せともに、いずれの接種孢子濃度区においても94~99%であり、接種孢子濃度によって付着器形成率に有意差は認められなかった。

Table 1. Effects of the densities of spore suspension on germination and formation of mature appressoria of *Pyricularia oryzae* Cav. on the rice leaves

Density of spore suspension (spores/ml)	Compatible combination ¹⁾			Incompatible combination ²⁾		
	No. of observed spores	Germination (%)	Appressorial formation (%)	No. of observed spores	Germination (%)	Appressorial formation (%)
5×10^4	428 ³⁾	98.4	95.3	441	99.5	96.1
1×10^4	445	99.3	95.5	561	98.9	94.8
5×10^3	497	99.0	96.9	441	99.4	94.1
1×10^3	450	99.3	98.4	479	99.4	96.2
5×10^2	359	98.6	95.5	352	98.3	95.7

1) The combination between race 037 (Ken 60-19) and var. Koshihikari.

2) The combination between race 037 (Ken 60-19) and var. Toride 1 (resistance gene *Pi-z^t*).

3) Fluorescence microscopical observation of spore germination and appressorial formation were carried out 9 hr after inoculation.

発芽率および付着器形成率の経時的変化

上記の実験で供試した範囲の接種孢子濃度によって、イネ葉身上での発芽率および成熟付着器形成率には差異が認められなかった。以後の実験は 5×10^3 個/ml の接種孢子濃度で行った。イネ品種コシヒカリ (親和性組合せ) およびとりで1号 (不親和性組合せ) の葉身上における接種孢子濃度の発芽率、未成熟および成熟付着器形成率の経時的変化を Fig. 2 に示した。孢子発芽率は接種後3時間目に親和性組合せで94%に、不親和性組合せで95%に達した。未成熟付着器形成率は接種後4時間目では親和性組合せで55%に、不親和性組合せで52%に達し、接種後6時間目ではそれぞれ87%と90%であった。成熟付着器形成は両組合せともに接種後4時間目か

ら開始し、接種後6時間目では親和性組合せで72%に、不親和性組合せで74%に達し、接種後8時間目にはそれぞれ93%と94%であった。以上のように、親和性と不親和性組合せにおいて、孢子の発芽率、未成熟および成熟付着器形成率の経時的変化に差異は認められなかった。

親和性および不親和性組合せ間での発芽率および付着器形成率の差異

いもち病の9判別品種およびコシヒカリの葉身上での、接種孢子濃度の発芽率および付着器形成率を Table 2 および Table 3 に示した。孢子懸濁液をイネ葉身上に接種した場合には、接種後4時間目で6つの親和性組合せ、4つの不親和性組合せおよび対照区のスライドグラ

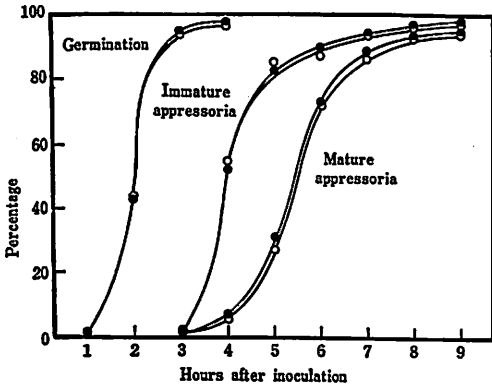


Fig. 2 Percentages of spore germination, immature and mature appressorial formation of *Pyricularia oryzae* Cav. on rice leaves in the compatible combination (○) of race 037 and var. Koshihikari and the incompatible combination (●) of race 037 and var. Toride 1.

ス上の孢子発芽率はいずれも 94~98 %であり、各組合せ間に有意差は認められなかった。成熟付着器形成率も上記の 10 組合せにおいて、接種後 9 時間目ですべて 93~97%であり、各組合せ間に有意差は認められなかった (Table 2)。

また、乾燥孢子をイネ葉身上に接種し、孢子の発芽および成熟付着器形成を接種後 9 時間目に観察した結果を、Table 3 に示した。孢子発芽率は各組合せおよびスライドガラス上において 47~52 %であり、各組合せ間に有意差は認められなかった。成熟付着器形成率も 10 組合せにおいて 45~49 %であり、各組合せ間に有意差は認められなかった。

考 察

イネいもち病菌の孢子発芽および付着器形成時にイネの抵抗性が発現するかどうかについては、これまで必ずしも明らかにされていない。鈴木¹¹⁾は付着器の形成され

Table 2 Percentages of spore germination and mature appressorial formation on the rice leaves of Japanese differential varieties and var. Koshihikari inoculated by spore suspension of *Pyricularia oryzae* Cav. race 037

Variety	(Resistance gene)	Combination	Germination ¹⁾		Appressorial formation ²⁾	
			No. of observed spores	Germinated spores (%)	No. of observed spores	Spores with appressoria (%)
Koshihikari	(+)	C ⁴⁾	1233	95.8	1267	94.0
Shin 2	(<i>Pi-h⁸</i>)	C	1372	96.9	1440	95.3
Aichi-asahi	(<i>Pi-a</i>)	C	1073	96.2	1146	94.9
Ishikari-shiroke	(<i>Pi-i</i>)	C	1064	94.7	1268	96.1
Kanto 51	(<i>Pi-k</i>)	C	1119	95.8	1240	94.3
Tsuyuake	(<i>Pi-h^m</i>)	C	1129	96.6	1120	95.7
Fukunishiki	(<i>Pi-z</i>)	I	1191	96.5	1297	93.3
Yashiro-mochi	(<i>Pi-ta</i>)	I	1249	96.3	1143	95.3
Pi No. 4	(<i>Pi-ta²</i>)	I	1159	97.7	1171	97.0
Toride 1	(<i>Pi-z^t</i>)	I	1271	96.0	1194	95.2
Check ³⁾	—	—	1262	97.7	—	—

1) 4 hr after inoculation.
 2) 9 hr after inoculation.
 3) Spore suspension was put on the glass slides.
 4) C: compatible combination, I: incompatible combination.

ている表皮細胞数が抵抗性品種においては感受性品種においてより少ないことを報告している。一方、河村・小野³⁾は付着器形成数は強抵抗性品種の観音仙で最も多く、次いで感受性品種の改良神力で多く、抵抗性品種の亀治で最も少ないことを報告している。これらの報告ではいずれも葉身上での付着器形成を観察するために、接種葉を石炭酸で煮沸して透明化を行っている。このため、未発芽孢子および付着器を形成していない孢子は、石炭酸中に脱落している可能性が考えられる。したがって、上記の報告における観察方法により、すべての接種孢子に対する付着器形成率を計測することは、必ずしも

適切ではないと思われる。

この点を考慮し、すでに安部・安田¹⁾は接種葉上に卵白グリセリンを、吉野¹⁵⁾はセロイジンを噴霧して、接種孢子の葉身上からの脱落を防止して脱色・染色を行っている。本実験では観察直前に蛍光色素カルコフルオールホワイト2,4,8)で染色した接種孢子を蛍光顕微鏡で観察した。この方法は簡便であり、しかも葉身上のすべての接種孢子を脱落させることなく観察できる。したがって、接種孢子すべてに対する発芽孢子、未成熟および成熟付着器形成孢子の百分率を正確に算出することが可能であった。イネ葉身上に孢子懸濁液を接種し、孢子の発芽率

Table 3. Percentages of spore germination and mature appressorial formation on the rice leaves of Japanese differential varieties and var. Koshihikari inoculated by dry spores of *Pyricularia oryzae* Cav. race 037

Variety	(Resistance gene)	Combination	No. of ¹⁾ observed spores	Germination (%)	Appressorial formation (%)
Koshihikari	(+)	C ²⁾	1430	48.5	47.0
Shin 2	(<i>Pi-k*</i>)	C	1365	50.1	48.1
Aichi-asahi	(<i>Pi-a</i>)	C	1305	49.8	47.4
Ishikari-shiroke	(<i>Pi-i</i>)	C	1451	50.0	45.6
Kanto 51	(<i>Pi-k</i>)	C	1396	51.2	47.8
Tsuyuake	(<i>Pi-k^m</i>)	C	1429	49.3	46.7
Fukunishiki	(<i>Pi-z</i>)	I	1333	48.5	46.2
Yashiro-mochi	(<i>Pi-ta</i>)	I	1450	48.2	45.9
Pi No.4	(<i>Pi-ta²</i>)	I	1392	49.3	47.0
Toride 1	(<i>Pi-z^t</i>)	I	1370	49.9	46.4
Check ²⁾	—	—	2392	47.4	—

1) Fluorescence microscopical observation of spore germination and appressorial formation was carried out 9 hr after inoculation.

2) Dry spores were put on the glass slides.

3) C: compatible combination, I: incompatible combination.

および付着器形成率をこの観察方法を用いて計測した結果、 $5 \times 10^2 \sim 5 \times 10^4$ 個/ml の接種孢子濃度の範囲ではいずれの孢子濃度でも発芽率は98%以上であった。しかも、高濃度の孢子接種によって発芽率が抑制される⁷⁾ことはなかった。さらに本実験で行った孢子懸濁液の接種では、親和性および不親和性組合せの両組合せにおいて、発芽率および付着器形成率に差異は認められなかった。

しかし、既報^{1,3,11,15)}および上述の本実験においては、いずれもイネ葉上に孢子懸濁液を接種しているので、温室中で形成される葉上水滴が稀釈される。したがって、葉上水滴の発芽および付着器形成に及ぼす影響³⁾が低下すると推測される。そこで、本実験では乾燥孢子を葉上に接種し、接種イネを温室に置き、自然に葉上水滴を形成させ、孢子発芽および付着器形成させる方法を採用した。しかし、この接種法によっても、各組合せのイネ葉上とスライドガラス上での孢子発芽率に有意差は認められず、また付着器形成率についても各組合せ間に有意差は認められなかった。このことから、葉上に自然に形成される水滴が孢子の発芽率および付着器形成率に及ぼす影響はないと考えられる。本実験結果は、葉上水滴が発芽および付着器形成に影響を及ぼすという河村・小野³⁾の実験結果と異なった。この理由として、河村・小野³⁾の実験では、葉上水滴を採取し、その水溶液中におけるいもち病菌の孢子発芽率および付着器形成率を計測しているの、孢子発芽および付着器形成の環境はイネ葉上における環境と異なっていることが挙げられる。

イネいもち病抵抗性の発現時期については、これまで病原菌の表皮細胞侵入時に起こることが報告されている^{5,6)}が、侵入前については明らかにされていない。本

実験における結果から、抵抗性は孢子発芽および付着器形成までの段階では発現されないことが推察された。

摘 要

抵抗性遺伝子が明らかにされている10品種のイネを供試し、葉身上におけるいもち病菌孢子の発芽および付着器形成について、親和性および不親和性組合せ間で比較観察した。本実験では、特にイネ葉上からの接種孢子の脱落を防止するための接種法および観察法を適用した。

1. 親和性および不親和性組合せともに、孢子懸濁液の濃度を異にしても、イネ葉身上での接種孢子の発芽率および付着器形成率に差異は認められなかった。

2. イネ葉身上孢子の発芽率、未成熟および成熟付着器形成率を経時的に計測した結果、親和性および不親和性組合せ間に差異は認められなかった。

3. イネ・いもち病菌の6つの親和性組合せと4つの不親和性組合せにおいて、葉身上に異なる2種の方法で接種を行った結果、孢子の発芽率および付着器形成率は、各組合せ間において有意差を示さなかった。

4. 以上の結果から、イネいもち病抵抗性は、病原菌のイネ葉身への侵入前には発現されないと考えられる。

引用文献

- 1) 安部卓爾・安田東 (1961) イモチ病菌の分生孢子発芽による付着器の形成とその病理学的意義について。京都府大学術報告、農学 13: 36~44.
- 2) 浅賀宏一 (1980) 蛍光色素によるいもち病菌分生孢子の染色と病原性。北日本病虫研報 31: 30~31.
- 3) 河村栄吉・小野小三郎 (1948) 稲葉上の水滴と稻熱病菌との関

- 係に関する研究. 農事試験報 4 : 1~12. 4) 久原重松 (1981) カンキツかいよう病菌の蛍光色素 (Calcofluor White) による生菌染色. 日植病報 47 : 113 (講要). 5) 古賀博則・小林尚志 (1982) 親和性および不親和性イネ・いもち病菌組合せにおける葉身での初期感染過程の比較. 日植病報 48 : 506~513. 6) 古賀博則・小林尚志 (1982) 不親和性いもち病菌レースに対するイネ品種とりで1号の葉身の細胞反応. 北陸病虫害報 30 : 12~18. 7) 小笠原長宏・玉利勤治郎・菅正倫 (1961) 稲熱病に関する生化学的研究 (第20報) いもち菌胞子の発芽機構(その2), いもち菌胞子中のピコリン酸について. 農化 35 : 1412~1416. 8) Rohringer, R., Kim, W. K., Samborski, D. J. and Howes, N. K. (1977) Calcofluor : An optical brightener for fluorescence microscope of fungal plant parasites in leaves. *Phytopathology* 67 : 808~810. 9) 関口義兼・古田力 (1966) いもち菌分生胞子の同時多量形成法. 日植病報 32 : 67 (講要). 10) 末田平七 (1928) 稲いもち病菌=関スル研究. 台湾総督府中央研究所農事部報 36 : 1~130. 11) 鈴木橋雄 (1940) 稲熱病に対する稲の感受性の差異と寄主体侵入との関係に就きて. 農及園 15 : 1999~2010. 12) Suzuki, H. (1939) Influence of physical and chemical factors upon the formation of appressoria in the conidia of *Piricularia Oryzae* I. Influence of oxygen. *Japanese Jour. Bot.* 10 : 321~324. 13) Suzuki, H. (1941) Influence of physical and chemical factors upon the formation of appressoria in the conidia of *Piricularia Oryzae* II. Influence of temperature. *Japanese Jour. Bot.* 11 : 357~376. 14) Yamada, M., Kiyosawa, S., Yamaguchi, T., Hirano, T., Kobayashi, T., Kushibuchi, K. and Watanabe, S. (1976) Proposal of a new method for differentiating races *Pyricularia oryzae* Cavara in Japan. *Ann. Phytopath. Soc. Japan* 42 : 216~219. 15) 吉野嶺一 (1979) いもち病菌の侵入に関する生態的研究. 北陸農試報 22 : 163~221.

(昭和58年8月20日受領)